

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

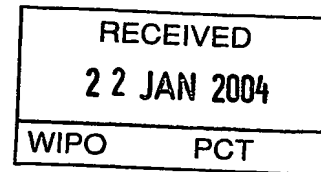
28.11.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application: 2002年12月26日

出 願 番 号  
Application Number: 特願2002-377078-  
[ST. 10/C]: [JP2002-377078]



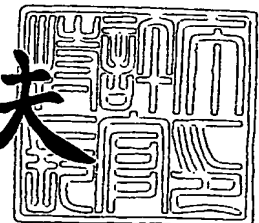
出 願 人  
Applicant(s): 中外製薬株式会社

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 1月 8日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今井康夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 C1-A0228

【提出日】 平成14年12月26日

【あて先】 特許庁長官殿

【発明者】

【住所又は居所】 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社  
社内

【氏名】 小嶋 哲郎

【発明者】

【住所又は居所】 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会  
社内

【氏名】 妹尾 千明

【発明者】

【住所又は居所】 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会  
社内

【氏名】 名取 修

【発明者】

【住所又は居所】 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会  
社内

【氏名】 糟谷 圭子

【発明者】

【住所又は居所】 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会  
社内

【氏名】 石井 慎也

【特許出願人】

【識別番号】 000003311

【氏名又は名称】 中外製薬株式会社

## 【代理人】

【識別番号】 100102978

## 【弁理士】

【氏名又は名称】 清水 初志

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100108774

## 【弁理士】

【氏名又は名称】 橋本 一憲

## 【手数料の表示】

【予納台帳番号】 041092

【納付金額】 21,000円

## 【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 ヘテロ受容体に対するアゴニスト抗体

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 ヘテロ鎖を含む受容体に対してアゴニスト活性を有する抗体

。

【請求項 2】 受容体がサイトカイン受容体である請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 3】 サイトカイン受容体がインターフェロン受容体である請求項 2 に記載の抗体。

【請求項 4】 インターフェロン受容体が I 型インターフェロン受容体である請求項 3 に記載の抗体。

【請求項 5】 I 型インターフェロン受容体が AR1 鎖及び AR2 鎖を含んでいることを特徴とする請求項 4 に記載の抗体。

【請求項 6】 受容体が多量体である請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 7】 多量体が二量体である請求項 6 に記載の抗体。

【請求項 8】 二種特異性抗体である請求項 1 ～ 7 のいずれかに記載の抗体

。

【請求項 9】 抗 AR1 鎖抗体の可変領域と、抗 AR2 鎖抗体の可変領域とを含む、請求項 5 に記載の抗体。

【請求項 10】 抗 AR1 鎖抗体における下記 (a) のアミノ酸配列からなる可変領域と、抗 AR2 鎖抗体における下記 (b 1) ～ (b 10) のいずれかに記載のアミノ酸配列からなる可変領域とを含む、請求項 9 に記載の抗体。

(a) H 鎖可変領域が配列番号：1 に記載のアミノ酸配列であり、L 鎖可変領域が配列番号：2 に記載のアミノ酸配列

(b 1) H 鎖可変領域が配列番号：7 に記載のアミノ酸配列であり、L 鎖可変領域が配列番号：8 に記載のアミノ酸配列

(b 2) H 鎖可変領域が配列番号：9 に記載のアミノ酸配列であり、L 鎖可変領域が配列番号：10 に記載のアミノ酸配列

(b 3) H 鎖可変領域が配列番号：19 に記載のアミノ酸配列であり、L 鎖可変領域が配列番号：20 に記載のアミノ酸配列

(b 4) H鎖可変領域が配列番号: 13に記載のアミノ酸配列であり、L鎖可変領域が配列番号: 14に記載のアミノ酸配列

(b 5) H鎖可変領域が配列番号: 23に記載のアミノ酸配列であり、L鎖可変領域が配列番号: 24に記載のアミノ酸配列

(b 6) H鎖可変領域が配列番号: 5に記載のアミノ酸配列であり、L鎖可変領域が配列番号: 6に記載のアミノ酸配列

(b 7) H鎖可変領域が配列番号: 17に記載のアミノ酸配列であり、L鎖可変領域が配列番号: 18に記載のアミノ酸配列

(b 8) H鎖可変領域が配列番号: 15に記載のアミノ酸配列であり、L鎖可変領域が配列番号: 16に記載のアミノ酸配列

(b 9) H鎖可変領域が配列番号: 21に記載のアミノ酸配列であり、L鎖可変領域が配列番号: 22に記載のアミノ酸配列

(b 10) H鎖可変領域が配列番号: 11に記載のアミノ酸配列であり、L鎖可変領域が配列番号: 12に記載のアミノ酸配列

【請求項 11】 抗AR1鎖抗体における下記 (a) のアミノ酸配列からなる可変領域と、抗AR2鎖抗体における下記 (b 1) ~ (b 3) のいずれかに記載のアミノ酸配列からなる可変領域とを含む、請求項 9 に記載の抗体。

(a) H鎖可変領域が配列番号: 3に記載のアミノ酸配列であり、L鎖可変領域が配列番号: 4に記載のアミノ酸配列

(b 1) H鎖可変領域が配列番号: 9に記載のアミノ酸配列であり、L鎖可変領域が配列番号: 10に記載のアミノ酸配列

(b 2) H鎖可変領域が配列番号: 9に記載のアミノ酸配列であり、L鎖可変領域が配列番号: 10に記載のアミノ酸配列

(b 3) H鎖可変領域が配列番号: 21に記載のアミノ酸配列であり、L鎖可変領域が配列番号: 22に記載のアミノ酸配列

【請求項 12】 請求項 1 ~ 11 のいずれかに記載の抗体を有効成分として含有する医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

**【発明の属する技術分野】**

本発明は、ヘテロ受容体に対するアゴニスト抗体、および該抗体を有効成分として含有する医薬組成物に関する。

**【0002】****【従来の技術】**

抗体は血中での安定性が高く、抗原性もないことから医薬品として注目されている。その中でも二種類の抗原を同時に認識できる二種特異性抗体が提唱されて久しいが、現状では二種類の抗原を単に繋ぐのみである。しかし抗体は抗原中の特定のエピトープに結合するため、適当な抗体の組み合わせを選べば二種特異性抗体によって2つの抗原を望む距離・角度に配位することが出来ると考えられる。

**【0003】**

多くのサイトカイン受容体はリガンドが結合することによって二量体を形成する鎖間の距離・角度が変化して細胞内にシグナルを伝え得るようになると考えられている。つまり適切な抗受容体抗体はリガンドによる受容体の二量体化を模倣でき、アゴニスト抗体となりうる。既にホモ二量体から成るMPL（特許文献1および非特許文献1参照）、EPO受容体、GH受容体、G-CSF受容体に対してアゴニスト作用を示すモノクローナル抗体が報告されている。

**【0004】**

しかしながら、ヘテロ二量体を形成する受容体の場合は、二種の受容体鎖の複合体を形成させる必要があるため一般的な抗体ではアゴニスト作用を期待できない。この目的には二種類の抗原を二本の腕でそれぞれ認識出来る上記の二種特異性抗体が適すると考えられるが、報告例は未だなかった。

**【0005】****【特許文献1】**

米国特許出願公開第98/17364号明細書

**【0006】****【非特許文献1】**

「Blood」、1998年、Vol.92、No.6、p.1981-1988

## 【0007】

## 【発明が解決しようとする課題】

本発明は、このような状況に鑑みてなされたものであり、その目的は、ヘテロ鎖を含む受容体に対してアゴニスト作用を有する抗体を提供することにある。

## 【0008】

## 【課題を解決するための手段】

本発明者らは上記課題を解決するため鋭意研究を行った。アゴニスト抗体のスクリーニングでは、受容体を構成する二種の鎖(A, B)それぞれに対する抗体( $\alpha$ 、 $\beta$ )を多数選択し、 $\alpha$ 、 $\beta$ の組み合わせについてひとつひとつ検定を行う必要がある。また二種特異性抗体の産生には、抗体産生ハイブリドーマ同士の融合、もしくは抗体の発現ベクターを細胞へ導入しなければならない。本発明者らは、例えば、以下のような方法によって、ヘテロ鎖からなる受容体に対してアゴニスト作用を有する二種特異性抗体を作製することに成功した。より具体的には、以下のようにして行った。

## 【0009】

動物に受容体のA鎖、B鎖それぞれを免疫した。この動物の脾細胞からmRNAを抽出し、抗体の相補性決定領域(CDR; complementarity determining region)に対応するプライマーを用いてRT-PCRにてL鎖、H鎖の可変領域を回収した。assembly PCRにて一本鎖Fv(scFv)を合成し、ファージライブラリーを構築した。パンニングによって抗原結合抗体クローンを濃縮・クローン化し、その一本鎖可変領域(scFv)を動物細胞用のシグナル配列とCH1-hinge-CH2-CH3の間に挿入し、scFv-CH1-Fc発現ベクターを作製した。様々な組み合わせで細胞に導入、抗体を発現させた。この培養上清を目的のリガンドに反応する細胞に添加し、リガンド同様の活性を示す抗体クローンを選択した。

## 【0010】

上記方法により、AR1, AR2の二種の鎖から成るI型インターフェロン受容体に対するアゴニスト抗体の分離に成功した。即ち本発明者らは、ヘテロ鎖からなる受容体に対してアゴニスト作用を有する二種特異性抗体を初めて分離することに成功し、本発明を完成させた。

## 【0011】

本発明は、ヘテロ鎖を含む受容体に対してアゴニスト作用を有する抗体に関し、より具体的には、

- 〔1〕 ヘテロ鎖を含む受容体に対してアゴニスト活性を有する抗体、
- 〔2〕 受容体がサイトカイン受容体である〔1〕に記載の抗体、
- 〔3〕 サイトカイン受容体がインターフェロン受容体である〔2〕に記載の抗体、
- 〔4〕 インターフェロン受容体がI型インターフェロン受容体である〔3〕に記載の抗体、
- 〔5〕 I型インターフェロン受容体がAR1鎖及びAR2鎖を含んでいることを特徴とする〔4〕に記載の抗体、
- 〔6〕 受容体が多量体である〔1〕に記載の抗体、
- 〔7〕 多量体が二量体である〔6〕に記載の抗体、
- 〔8〕 二種特異性抗体である〔1〕～〔7〕のいずれかに記載の抗体、
- 〔9〕 抗AR1鎖抗体の可変領域と、抗AR2鎖抗体の可変領域とを含む、〔5〕に記載の抗体、
- 〔10〕 抗AR1鎖抗体における下記（a）のアミノ酸配列からなる可変領域と、抗AR2鎖抗体における下記（b1）～（b10）のいずれかに記載のアミノ酸配列からなる可変領域とを含む、〔9〕に記載の抗体、
  - （a） H鎖可変領域が配列番号：1に記載のアミノ酸配列であり、L鎖可変領域が配列番号：2に記載のアミノ酸配列
  - （b1） H鎖可変領域が配列番号：7に記載のアミノ酸配列であり、L鎖可変領域が配列番号：8に記載のアミノ酸配列
  - （b2） H鎖可変領域が配列番号：9に記載のアミノ酸配列であり、L鎖可変領域が配列番号：10に記載のアミノ酸配列
  - （b3） H鎖可変領域が配列番号：19に記載のアミノ酸配列であり、L鎖可変領域が配列番号：20に記載のアミノ酸配列
  - （b4） H鎖可変領域が配列番号：13に記載のアミノ酸配列であり、L鎖可変領域が配列番号：14に記載のアミノ酸配列



(b 5) H鎖可変領域が配列番号: 23 に記載のアミノ酸配列であり、L鎖可変領域が配列番号: 24 に記載のアミノ酸配列

(b 6) H鎖可変領域が配列番号: 5 に記載のアミノ酸配列であり、L鎖可変領域が配列番号: 6 に記載のアミノ酸配列

(b 7) H鎖可変領域が配列番号: 17 に記載のアミノ酸配列であり、L鎖可変領域が配列番号: 18 に記載のアミノ酸配列

(b 8) H鎖可変領域が配列番号: 15 に記載のアミノ酸配列であり、L鎖可変領域が配列番号: 16 に記載のアミノ酸配列

(b 9) H鎖可変領域が配列番号: 21 に記載のアミノ酸配列であり、L鎖可変領域が配列番号: 22 に記載のアミノ酸配列

(b 10) H鎖可変領域が配列番号: 11 に記載のアミノ酸配列であり、L鎖可変領域が配列番号: 12 に記載のアミノ酸配列

[11] 抗AR1鎖抗体における下記 (a) のアミノ酸配列からなる可変領域と、抗AR2鎖抗体における下記 (b 1) ~ (b 3) のいずれかに記載のアミノ酸配列からなる可変領域とを含む、[9] に記載の抗体、

(a) H鎖可変領域が配列番号: 3 に記載のアミノ酸配列であり、L鎖可変領域が配列番号: 4 に記載のアミノ酸配列

(b 1) H鎖可変領域が配列番号: 9 に記載のアミノ酸配列であり、L鎖可変領域が配列番号: 10 に記載のアミノ酸配列

(b 2) H鎖可変領域が配列番号: 9 に記載のアミノ酸配列であり、L鎖可変領域が配列番号: 10 に記載のアミノ酸配列

(b 3) H鎖可変領域が配列番号: 21 に記載のアミノ酸配列であり、L鎖可変領域が配列番号: 22 に記載のアミノ酸配列

[12] [1] ~ [11] のいずれかに記載の抗体を有効成分として含有する医薬組成物、を提供するものである。

#### 【0012】

#### 【発明の実施の形態】

本発明は、ヘテロ鎖を含む受容体に対してアゴニスト活性を有する抗体を提供する。

## 【0013】

本発明においてヘテロ鎖を含む受容体とは、受容体（多量体）が異なる2つ以上のタンパク質（受容体鎖）で構成されていることをいう。多量体は二量体、三量体、四量体など、そのタンパク質（受容体鎖）数により限定はされないが、好ましくは二量体である。例えば、受容体が二量体の場合には、ヘテロ受容体は2つの構成タンパク質（受容体鎖）が同一でないことを表す。

## 【0014】

アゴニスト活性を有する抗体とは、ある受容体に対して、アゴニスト作用を有する抗体を指す。一般的に、アゴニストであるリガンド（因子）が受容体と結合すると、受容体タンパク質の立体構造が変化し、受容体が活性化（受容体が膜タンパク質である場合には、通常、細胞増殖などのシグナルを発する）される。二量体を形成するタイプの受容体である場合には、アゴニスト抗体は適切な距離、角度で受容体を二量体化させることにより、リガンドと同様の働きをすることができる。つまり、適当な抗受容体抗体はリガンドにより受容体の二量体化を模倣でき、アゴニスト抗体となり得る。

## 【0015】

本発明の好ましい態様においては、本発明の受容体としてサイトカイン受容体を挙げることができる。サイトカインは、通常、各種の血球細胞の増殖と分化を制御する生理活性タンパク質の総称として用いられるが、非免疫系細胞を含む細胞の増殖因子及び増殖抑制因子を指すこともある。従って、サイトカインは細胞から放出され、免疫、炎症反応の制御作用、抗ウイルス作用、抗腫瘍作用、細胞増殖・分化の調節作用など細胞間相互作用を媒介するタンパク質性因子の総称である。

## 【0016】

サイトカインの具体的な例としては、インターロイキン1～15、コロニー刺激因子（G-CSF、M-CSF、GM-CSFなど）、インターフェロン（IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$ 、IFN- $\gamma$ 、など）、ケモカイン、腫瘍壊死因子（TNF）、リンホトキシン、エリスロポエチン、上皮増殖因子、繊維芽細胞増殖因子などを挙げることができるが、好ましくはインターフェロンであり、特に好ましくはI型インターフェロンである

## 【0017】

サイトカイン受容体の具体的な例として、インターフェロン受容体ファミリー (IFN- $\alpha$  受容体、IFN- $\beta$  受容体、IFN- $\gamma$  受容体、IL-10受容体、など)、インターロイキン受容体ファミリー (IL-2受容体、IL-3受容体、IL-6受容体、GM-CSF受容体、など)、セリントレオニンキナーゼ型受容体ファミリー (BMP受容体、TGF- $\beta$  受容体、アクチビン受容体、など)、チロシンキナーゼ型受容体 (EGF受容体、PDGF受容体、VEGF受容体、c-kit受容体、c-fms受容体、など)、免疫グロブリン受容体ファミリー (IL-1受容体、など)、細胞死受容体ファミリー (TNF受容体、Fas受容体、NGF受容体、など)、7回膜貫通型受容体ファミリー (IL-8受容体、ケモカイン受容体、など)などを挙げることができるが、好ましくはインターフェロン受容体ファミリーであり、さらに好ましくはI型インターフェロン受容体である。

## 【0018】

インターフェロンにはIFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$ 、IFN- $\gamma$ 、IFN- $\tau$ などが含まれる。IFN- $\alpha$ とIFN- $\beta$ は相同性が高い為、これら2つのIFNは同一のレセプターを介して反応することができる。又、インターフェロン $\alpha$ とインターフェロン $\beta$ はI型インターフェロンに分類される。

## 【0019】

I型インターフェロン受容体の好ましい例として、AR1鎖 (GenBank ACCESSION No : J03171、文献: Uze G, Lutfalla G, Gresser I. Genetic transfer of a functional human interferon [[alpha]] receptor into mouse cells: cloning and expression of its cDNA. Cell 1990;60:225- 34.) およびAR2鎖 (GenBank ACCESSION No : U29584、文献: Domanski P, Witte M, Kellum M, Rubinstein M, Hackett R, Pitha P, et al. Cloning and expression of a long form of the [[beta]] subunit of the interferon [[alpha]]/[[beta]] receptor that is required for signalling. J Biol Chem 1995;270:21606- 11. ; Lutfalla G, Holland SJ, Cinato E, Monneron -D., Reboul J, Rogers NC, et al. Mutant U5 A cells are complemented by an interferon-  $\alpha$  receptor subunit generated

by alternative processing of a new member of a cytokine receptor gene cluster. EMBO J 1995;14:5100- 8.) を有する受容体を挙げることができる。

#### 【0020】

多種特異性抗体とは、異なる多種の抗原と特異的に結合し得る抗体を言う。つまり、多種特異性抗体は少なくとも2種類の異なる抗原に対して特異性を有する抗体である（例えば、抗原がヘテロ受容体の場合には、多種特異性抗体はヘテロ受容体を構成する異なるドメインを認識する）。通常、このような分子は2個の抗原と結合するものであるが（二種特異性抗体：bispecific抗体）、それ以上の（例えば、3種類の）抗原に対して特異性を有していてもよい。

#### 【0021】

本発明のヘテロ受容体に対する抗体は、特に制限されないが、モノクローナル抗体であることが好ましい。また、遺伝子組換え技術を用いて産生させた組換え型抗体であることが好ましい。（例えば、Borrebaeck, C. A. K. and Larrick, J. W., THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES, Published in the United Kingdom by MACMILLAN PUBLISHERS LTD, 1990 参照）。組換え型抗体は、それをコードするDNAをハイブリドーマ、または抗体を産生する感作リンパ球等の抗体産生細胞からクローニングし、適当なベクターに組み込んで、これを宿主に導入し産生させることにより得ることができる。

#### 【0022】

さらに、本発明の抗体は、その抗体断片や抗体修飾物であってよい。たとえば、抗体断片としては、Fab、F(ab')<sub>2</sub>、Fv又は重鎖と軽鎖のFvを適当なリンカーで連結させたシングルチェーンFv(scFv) (Huston, J. S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1988) 85, 5879-5883) が挙げられる。具体的には、抗体を酵素、例えば、パパイン、ペプシンで処理し抗体断片を生成させることによって、抗体断片を得ることができる。または、これら抗体断片をコードする遺伝子を構築し、これを発現ベクターに導入した後、適当な宿主細胞で発現させる（例えば、Co, M. S. et al., J. Immunol. (1994) 152, 2968-2976 ; Better, M. and Horwitz, A. H., Methods Enzymol. (1989) 178, 476-496 ; Pluckthun, A. and Skerra, A., Methods Enzymol. (1989) 178, 497-515 ; Lamoyi, E., Methods E

nzymol. (1986) 121, 652-663 ; Rousseaux, J. et al., Methods Enzymol. (1986) 121, 663-669 ; Bird, R. E. and Walker, B. W., Trends Biotechnol. (1991) 9, 132-137参照)。

#### 【0023】

その他の断片としては、ダイアボディ(diabody)、線状抗体、一本鎖抗体分子などが含まれる。ここで、「Fv」断片は最小の抗体断片であり、完全な抗原認識部位と結合部位を含む。この領域は1つの重鎖および軽鎖の可変領域が非共有結合により強く連結されたダイマーである( $V_H$ - $V_L$ ダイマー)。各可変領域の3つのCDRが相互作用し、 $V_H$ - $V_L$ ダイマーの表面に抗原結合部位を形成する。6つのCDRが抗体に抗原結合部位を付与している。しかしながら、1つの可変領域(または、抗原に特異的な3つのCDRのみを含むFvの半分)であっても、全結合部位よりも親和性は低いが、抗原を認識し、結合する能力を有する。

#### 【0024】

また、Fab断片(F(ab)とも呼ばれる)はさらに、軽鎖の定常領域および重鎖の定常領域(CH1)を含む。Fab'断片は、抗体のヒンジ領域からの1またはそれ以上のシステインを含む重鎖CH1領域のカルボキシ末端由来の数個の残基を付加的に有する点でFab断片と異なっている。Fab'-SHとは、定常領域の1またはそれ以上のシステイン残基が遊離のチオール基を有するFab'を示すものである。F(ab')断片は、F(ab')<sub>2</sub>ペプシン消化物のヒンジ部のシステインにおけるジスルフィド結合の切断により製造される。化学的に結合されたその他の抗体断片も当業者には知られている。

#### 【0025】

ダイアボディ(diabody; Db)は、遺伝子融合により構築された二価(bivalent)の抗体断片を指す(P.Holliger et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90: 6444-6448 (1993)、EP404,097号、W093/11161号等)。ダイアボディは、2本のポリペプチド鎖から構成されるダイマーであり、ポリペプチド鎖は各々、同じ鎖中で軽鎖可変領域(VL)及び重鎖可変領域(VH)が、互いに結合できない位に短い、例えば、5残基程度のリンカーにより結合されている。同一ポリペプチド鎖上にコードされるVLとVHとは、その間のリンカーが短いため単鎖V領域フラグメントを形成するこ

とが出来ず二量体を形成するため、ダイアボディは2つの抗原結合部位を有することとなる。このとき2つの異なる抗原(a、b)に対するVLとVHをVL<sub>a</sub>-VH<sub>b</sub>とVL<sub>b</sub>-VH<sub>a</sub>の組合わせで5残基程度のリンカーで結んだものを同時に発現させると二種特異性Dbとして分泌される。

#### 【0026】

一本鎖抗体（以下、scFvとも記載する）またはscFv抗体断片には、抗体のV<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>領域が含まれ、これらの領域は単一のポリペプチド鎖中に存在する。一般に、FvポリペプチドはさらにV<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>領域の間にポリペプチドリンカーを含んでおり、これによりscFvは、抗原結合のために必要な構造を形成することができる（scFvの総説については、Pluckthun『The Pharmacology of Monoclonal Antibodies』Vol.113 (Rosenburg and Moore ed (Springer Verlag, New York) pp.269-315, 1994) を参照）。本発明におけるリンカーは、その両端に連結された抗体可変領域の発現を阻害するものでなければ特に限定されない。

#### 【0027】

抗体修飾物としては、例えば、ポリエチレングリコール（PEG）等の各種分子と結合した抗体や、細胞障害性物質、エンドトキシン、放射性物質などと結合した抗体を挙げることができる。本発明の抗体修飾物においては、結合される物質は限定されない。このような抗体修飾物を得るには、得られた抗体に化学的な修飾を施すことによって得ることができる。これらの方法はこの分野において既に確立されている。

#### 【0028】

本発明の抗体は、ヒト抗体、マウス抗体、ラット抗体など、その由来は限定されない。またキメラ抗体やヒト型化抗体などの遺伝子改変抗体でもよい。

#### 【0029】

ヒト抗体の取得方法は既に知られており、例えば、ヒト抗体遺伝子の全てのレパートリーを有するトランスジェニック動物を目的の抗原で免疫することで目的のヒト抗体を取得することができる（国際特許出願公開番号WO 93/12227, WO 92/03918, WO 94/02602, WO 94/25585, WO 96/34096, WO 96/33735参照）。

#### 【0030】

遺伝子改変抗体は、既知の方法を用いて製造することができる。具体的には、たとえばキメラ抗体は、免疫動物の抗体の重鎖、および軽鎖の可変領域と、ヒト抗体の重鎖および軽鎖の定常領域からなる抗体である。免疫動物由来の抗体の可変領域をコードするDNAを、ヒト抗体の定常領域をコードするDNAと連結し、これを発現ベクターに組み込んで宿主に導入し産生させることによって、キメラ抗体を得ることができる。

#### 【0031】

ヒト型化抗体は、再構成 (reshaped) ヒト抗体とも称される改変抗体である。ヒト型化抗体は、免疫動物由来の抗体のCDRを、ヒト抗体の相補性決定領域へ移植することによって構築される。その一般的な遺伝子組換え手法も知られている。

#### 【0032】

具体的には、マウス抗体のCDRとヒト抗体のフレームワーク領域 (framework region; FR) を連結するように設計したDNA配列を、末端部にオーバーラップする部分を有するように作製した数個のオリゴヌクレオチドからPCR法により合成する。得られたDNAをヒト抗体定常領域をコードするDNAと連結し、次いで発現ベクターに組み込んで、これを宿主に導入し産生させることにより得られる (欧州特許出願公開番号EP 239400、国際特許出願公開番号WO 96/02576参照)。CDRを介して連結されるヒト抗体のFRは、相補性決定領域が良好な抗原結合部位を形成するものが選択される。必要に応じ、再構成ヒト抗体の相補性決定領域が適切な抗原結合部位を形成するように抗体の可変領域のフレームワーク領域のアミノ酸を置換してもよい (Sato, K. et al., Cancer Res. (1993) 53, 851-856)。

#### 【0033】

本発明のアゴニスト抗体を得る方法は特に制限されず、どのような方法で取得されてもよい。例えば、二種の鎖 (A鎖, B鎖) からなるヘテロ受容体に対するアゴニスト抗体を得る場合、受容体を構成する二種の鎖 (A, B) それぞれで免疫動物を免疫し、複数の抗A鎖抗体及び複数の抗B鎖抗体を取得する。その後、抗A鎖抗体のH鎖とL鎖及び抗B鎖抗体のH鎖とL鎖を含む二種特異性抗体を作製する。ここで、抗A鎖抗体と抗B鎖抗体はそれぞれ複数種得られているので、なるべ

く多くの組み合わせの二種特異性抗体を作製することが好ましい。二種特異性抗体を作製後、アゴニスト活性を有する抗体を選択する。

#### 【0034】

本発明の一つの態様においては、本発明の抗体は二種特異性抗体である。二種特性抗体の作製は、抗体産生ハイブリドーマ同士の融合、もしくは抗体の発現ベクターの細胞導入などの公知の方法により行うことができる。例えば、動物に受容体のA鎖、B鎖それぞれを免疫する。この動物の脾細胞からmRNAを抽出し、CDRに対応するプライマーを用いてRT-PCRにてL鎖、H鎖の可変領域を回収する。assembly PCRにて一本鎖Fv(scFv)を合成し、ファージライブラリーを構築する。パンニングによって抗原結合抗体クローンを濃縮・クローン化し、その一本鎖可変領域(scFv)を動物細胞用のシグナル配列とCH1-hinge-CH2-CH3の間に挿入し、scFv-CH1-Fc発現ベクターを作製する。抗A鎖抗体をコードするベクターと抗B鎖抗体をコードするベクターを同一の細胞に導入し、抗体を発現させることにより二種特異性抗体を得ることができる。

#### 【0035】

アゴニスト活性を有する抗体の選択は、例えば、以下のような方法により行うことができる。

(1) 因子依存的に増殖する細胞の培養時に抗体を添加することによって、因子同様に細胞が増殖するか否かを指標とする。細胞が増殖する場合に、被験多種特異性抗体は、アゴニスト作用を有するものと判定する。

(2) 因子の本来の活性(増殖とは限らない)を示す細胞株の培養時に加えることによって、因子同様の反応を示すか否かを指標とする。因子同様の反応を示す場合に、抗体は、アゴニスト作用を有するものと判定する。

#### 【0036】

上記細胞は、通常、本発明の抗体がアゴニストとして作用し得る受容体を、細胞表面において発現しており、該受容体のリガンド(例えば、アゴニスト抗体)と結合することにより、細胞増殖シグナルを発する。従って上記方法において使用する細胞は、受容体のリガンド(因子)依存的に増殖できる細胞(因子依存性増殖細胞)であることが好ましい。また、上記受容体は、通常、リガンドと結合



することにより、細胞増殖シグナルを発するものであることが好ましい。しかし、上記受容体が細胞増殖シグナルを出さないタイプのものである場合、該受容体を、細胞増殖シグナルを発するタイプの受容体と融合させ、所謂キメラ受容体とすることにより、上記方法に使用することができる。該キメラ受容体は、リガンドと結合することにより、細胞増殖シグナルを発する。受容体と融合させることによりキメラ受容体を構築するのに適した受容体は、細胞増殖シグナルを発するタイプの受容体であれば特に制限されないが、通常、膜タンパク質であり、より好ましくは細胞外がリガンド受容体鎖であり細胞内が受容体鎖であるような受容体である。具体的には、G-CSF受容体、mpl、neu、GM-CSF受容体、EPO受容体、c-Kit、FLT-3等を挙げることができる。本発明における上記因子依存性増殖細胞の好適な例として、具体的には、細胞外がリガンド受容体鎖であり細胞内がG-CSF受容体鎖であるキメラ受容体を発現させた因子依存性増殖細胞BaF3を示すことができる。その他、上記方法において使用できる細胞として、例えば、NFS60、FDC P-1、FDCP-2、CTLL-2、DA-1、KT-3等を挙げることができる。

#### 【0037】

受容体に対する抗体は、当業者に公知の方法により得ることができる。例えば、免疫動物に対して抗原を免疫化することにより調製することができる。動物を免疫化する抗原としては、免疫原性を有する完全抗原と、免疫原性を有さない不完全抗原（ハプテンを含む）が挙げられる。本発明においては、本発明のアゴニスト抗体がリガンドとして作用すると考えられる受容体を、上記抗原（免疫原）として使用する。本発明における上記受容体は特に制限されないが、好ましくはヘテロ二量体である。免疫化する動物として、例えば、マウス、ハムスター、またはアカゲザル等を用いることができる。これら動物に対して、抗原を免疫化することは、当業者においては、周知の方法によって行うことができる。本発明において好ましくは、免疫化された動物または該動物の細胞から抗体のL鎖およびH鎖の可変領域の回収を行う。この操作は、当業者においては一般的に公知の技術を用いて行うことができる。抗原によって免疫化された動物は、とりわけ脾臓細胞において該抗原に対する抗体を発現する。従って、例えば、免疫化された動物の脾臓細胞からmRNAを調製し、該動物のCDRに対応するプライマーを用いて、R

T-PCRによりL鎖およびH鎖の可変領域の回収を行うことができる。ここで、CDRとは、抗体の可変領域中の超可変領域に存在し、抗原と相補的に直接結合する3つの領域(CDR1、CDR2、CDR3)を指す。CDRに対応するプライマーとしては、例えば、CDRよりも多様性の低いフレームワークに対応するプライマー、あるいはシグナル配列とCH1、CL部分に対応するプライマーを用いることができる。また、*in vitro*においてリンパ球を免疫化することもできる。その後、免疫化された動物の脾臓またはリンパ球中に含まれる抗体をコードするDNAを、慣用の方法、例えば、抗体重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することができるヌクレオチドプローブ等を用いる方法により単離する。

#### 【0038】

免疫原とする受容体は、該受容体を構成するタンパク質全体、もしくは該タンパク質の部分ペプチドであってもよい。また、動物を免疫するのに用いる免疫原としては、場合により抗原となるものを他の分子に結合させ可溶性抗原とすることも可能であり、また、場合によりそれらの断片を用いてもよい。受容体のような膜貫通分子を抗原として用いる場合、これらの断片(例えば、受容体の細胞外領域)を用いるのが好ましい。また、膜貫通分子を細胞表面上に発現する細胞を免疫原とすることもできる。このような細胞は天然(腫瘍セルライン等)由来、または、組換え技術により膜貫通分子を発現するように構成された細胞であってもよい。

#### 【0039】

得られた抗体は、均一にまで精製することができる。抗体の分離、精製は通常のタンパク質で使用されている分離、精製方法を使用すればよい。例えばアフィニティークロマトグラフィー等のクロマトグラフィーカラム、フィルター、限外濾過、塩析、透析、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動等を適宜選択、組み合わせれば、抗体を分離、精製することができる(Antibodies : A Laboratory Manual. Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988)が、これらに限定されるものではない。アフィニティークロマトグラフィーに用いるカラムとしては、プロテインAカラム、プロテインGカラムが挙げられる。例えばプロテインAカラムを用いたカラムとして、Hyper D, POROS, S

epharose F. F. (Pharmacia) 等が挙げられる。

#### 【0040】

本発明の抗体は、例えば、AR1鎖およびAR2鎖を含むI型インターフェロン受容体に対してアゴニスト活性を有する抗体である場合には、好ましくは、抗AR1鎖抗体における可変領域と、抗AR2鎖抗体における可変領域とを含む構造を有する。該抗体としては、特に制限されるものではないが、例えば、抗AR1鎖抗体の下記のいずれかの可変領域と、抗AR2鎖抗体の下記のいずれかの可変領域とを含む抗体を挙げることができる。

- ・抗AR1鎖抗体の可変領域: AR1-41、AR1-24
- ・抗AR2鎖抗体の可変領域: AR2-37、AR2-11、AR2-13、AR2-45、AR2-22、AR2-43、AR2-40、AR2-14、AR2-44、AR2-33、AR2-31

#### 【0041】

上記のそれぞれの可変領域のVHおよびVLのアミノ酸配列を、配列番号: 1~26に示す(各可変領域のVHおよびVLと、配列番号との関係を表1に示す)。

#### 【0042】

【表1】

可変領域	配列番号	
	VH	VL
AR1-41	1	2
AR1-24	3	4
AR2-37	5	6
AR2-11	7	8
AR2-13	9	10
AR2-45	11	12
AR2-22	13	14
AR2-43	15	16

AR2-40	1 7	1 8
AR2-14	1 9	2 0
AR2-44	2 1	2 2
AR2-33	2 3	2 4
AR2-31	2 5	2 6

---

## 【0043】

抗AR1鎖抗体がAR1-24の場合、パートナーとなる抗AR2鎖抗体は、AR2-13、AR2-31、あるいはAR2-44であることが好ましく、抗AR1鎖抗体がAR1-41の場合、パートナーとなる抗AR2鎖抗体は、AR2-11、AR2-13、AR2-14、AR2-22、AR2-33、AR2-37、AR2-40、AR2-43、AR2-44、あるいはAR2-45であることが好ましい。AR2-13およびAR2-44は、AR1-41およびAR1-24の両方の抗体に対してパートナーとなることが可能である。上記のような対を形成する抗体もまた、本発明に含まれる。

## 【0044】

また、本発明で開示されている可変領域を用いて全長抗体を作製する場合、定常領域は特に限定されず、当業者に公知の定常領域を用いることが可能であり、例えば、Sequences of proteins of immunological interest, (1991), U.S. Department of Health and Human Services. Public Health Service National Institutes of Healthや、An efficient route to human bispecific IgG, (1998) . Nature Biotechnology vol. 16, 677-681、等に記載されている定常領域を用いることができる。

## 【0045】

本発明の抗体はアゴニスト作用を有することから、該抗体が作用する受容体の活性（機能）低下に起因する疾病に対して、有効な薬剤となることが期待される。即ち本発明は、本発明の抗体を有効成分として含有する医薬組成物を提供する。例えば、本発明の抗体がサイトカイン受容体に対してアゴニスト活性を有する抗体である場合には、該抗体はサイトカイン様作用を有するものと考えられる。従って該抗体は抗ウイルス作用、抗腫瘍作用、細胞増殖・分化調節作用を有する医薬品（医薬組成物）となることが期待される。

## 【0046】

治療または予防目的で使用される本発明の抗体を有効成分として含む医薬組成物は、必要に応じて、それらに対して不活性な適当な薬学的に許容される担体、媒体等と混和して製剤化することができる。例えば、滅菌水や生理食塩水、安定剤、賦形剤、酸化防止剤(アスコルビン酸等)、緩衝剤(リン酸、クエン酸、他の有機酸等)、防腐剤、界面活性剤(PEG、Tween等)、キレート剤(EDTA等)、結合剤等を挙げることができる。また、その他の低分子量のポリペプチド、血清アルブミン、ゼラチンや免疫グロブリン等の蛋白質、グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン及びリシン等のアミノ酸、多糖及び単糖等の糖類や炭水化物、マンニトールやソルビトール等の糖アルコールを含んでいてもよい。注射用の水溶液とする場合には、例えば生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液、例えば、D-ソルビトール、D-マンノース、D-マンニトール、塩化ナトリウムが挙げられ、適当な溶解補助剤、例えばアルコール(エタノール等)、ポリアルコール(プロピレングリコール、PEG等)、非イオン性界面活性剤(ポリソルベート80、HCO-50)等と併用してもよい。

## 【0047】

また、必要に応じ本発明の抗体をマイクロカプセル(ヒドロキシメチルセルロース、ゼラチン、ポリ[メチルメタクリル酸]等のマイクロカプセル)に封入したり、コロイドドラッグデリバリーシステム(リポソーム、アルブミンミクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子及びナノカプセル等)とすることもできる("Remington's Pharmaceutical Science 16th edition", Oslo Ed. (1980)等参照)。さらに、薬剤を徐放性の薬剤とする方法も公知であり、本発明の抗体に適用し得る(Langer et al., J.Biomed.Mater.Res. 15: 167-277 (1981); Langer, chem.Tech. 12: 98-105 (1982); 米国特許第3,773,919号; 欧州特許出願公開(EP)第58,481号; Sidman et al., Biopolymers 22: 547-556 (1983); EP第133,988号)。

## 【0048】

本発明の医薬組成物の投与量は、剤型の種類、投与方法、患者の年齢や体重、患者の症状、虚血性心不全の種類や進行の程度等を考慮して、最終的には医師の

判断により適宜決定されるものであるが、一般に大人では、1日当たり、0.1~200mgを1~数回に分けて経口投与することができる。より好ましくは1~1000mg/日、更により好ましくは50~500mg/日、最も好ましくは100~300mg/日である。これらの投与量は患者の体重や年齢、投与方法などにより変動するが、当業者であれば適当な投与量を適宜選択することが可能である。投与期間も、患者の治療経過等に応じて適宜決定することが好ましい。

#### 【0049】

また、本発明の抗体をコードする遺伝子を遺伝子治療用ベクターに組み込み、遺伝子治療を行うことも考えられる。投与方法としては、nakedプラスミドによる直接投与の他、リポソーム等にパッケージングするか、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、ポックスウイルスベクター、アデノウイルス関連ベクター、HVJベクター等の各種ウイルスベクターとして形成するか(Adolph『ウイルスゲノム法』, CRC Press, Florida (1996)参照)、または、コロイド金粒子等のビーズ担体に被覆(W093/17706等)して投与することができる。しかしながら、生体内において抗体が発現され、その作用を発揮できる限りいかなる方法により投与してもよい。好ましくは、適当な非経口経路(静脈内、腹腔内、皮下、皮内、脂肪組織内、乳腺組織内、吸入または筋肉内の経路を介して注射、注入、またはガス誘導性粒子衝撃法(電子銃等による)、添鼻薬等粘膜経路を介する方法等)により十分な量が投与される。ex vivoにおいてリポソームトランスフェクション、粒子衝撃法(米国特許第4,945,050号)、またはウイルス感染を利用して血液細胞及び骨髓由来細胞等に投与して、該細胞を動物に再導入することにより本発明の抗体をコードする遺伝子を投与してもよい。

#### 【0050】

##### 【実施例】

以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

##### 〔実施例1〕 抗原および免疫

ヒトAR1及びAR2それぞれの細胞外領域のC末端にFLAGもしくはHis6のタグを付加した可溶性受容体の発現ベクターをCHO細胞に導入し、その培養上清からアフ

イニテーターカラムを用いて精製した。マウスプロB細胞株BaF3にヒトAR1の細胞外領域とG-CSF受容体とのキメラ分子の発現ベクターを導入し、高発現細胞を樹立した。同様にヒトAR2の細胞外領域とG-CSF受容体とのキメラ分子の高発現細胞を樹立した。それぞれの細胞をBALB/cの腹腔に免疫した。脾臓を摘出する3日前にAR1HisもしくはAR2Hisを静注した。

### 【0051】

〔実施例2〕 scFv提示ライブラリーからの抗体分離

(a) ファージライブラリーのパンニング

免疫マウスの脾臓よりpolyA(+)RNAを抽出し、RT-PCRにてscFvを合成し、scFvがf1ファージのgene3との融合蛋白として発現するプラスミドライブラリーを構築した(J. Immun. Methods, 201, (1997), 35-55)。ライブラリーの大腸菌 ( $2 \times 10^9$ cfu) を50 mL 2xYTAG (100  $\mu$ g/mLアンピシリン、2%グルコースを含む2xTY) に植菌し、OD 600 0.4~0.5まで37℃にて培養した。 $4 \times 10^{11}$ のヘルパーファージVCSM13を加え37℃、15分間静置して感染させた。ここに450 mL 2xYTAG、25  $\mu$ L 1mol/L IPTGを添加し、26℃ 10時間培養した。遠心分離にて培養上清を回収し、100mL PEG-NaCl (10%ポリエチレングリコール8000, 2.5 mol/L NaCl) を混合後、4℃、60分間静置した。10,800 x g、30分間遠心にてファージを沈殿させ、沈殿物を40 mLの水に懸濁し、8 mL PEG-NaClを混合後、4℃、20分間静置した。10,800 x g、30分間遠心にてファージを沈殿させ5 mL PBSに懸濁した。AR1FLAGとAR2FLAGはNo-Weigh Premeasured NHS-PE04-Biotin Microtubes (Pierce) を用いてビオチン標識した。ファージライブラリーに100 pmolのビオチン標識AR1FLAGもしくはAR2FLAGを加え、60分間抗原と接触させた。5% M-PBS (5%スキムミルクを含むPBS) で洗浄したStreptavidin MagneSphere (Promega) 600  $\mu$ Lを加え、15分間結合させた。ビーズを1 mLのPBST (0.1% Tween-20を含むPBS) とPBSにて3回ずつ洗浄した。0.8 mLの0.1 mol/L グリシン/HCl (pH2.2) 中にビーズを5分間懸濁し、ファージを溶出した。回収したファージ溶液に45  $\mu$ L 2 mol/L Trisを添加して中和し、対数増殖期 (OD 600 0.4~0.5) XL1-Blue 10 mLに添加、37℃、30分間静置することで感染させた。これを2xYTAGプレートに広げ、30℃で培養した。コロニーを回収し、2xYTAGに植菌、OD 600 0.4~0.5まで37℃にて培養した

。培養液10 mLに5 $\mu$ L 1mol/L IPTG、10<sup>11</sup> pfuヘルパーファージ (VCSM13) を添加し37℃ 30分間静置した。遠心集菌後、25 $\mu$ g/mLカナマイシンを含む2xYTAG 100mLに再懸濁し、30℃、10時間培養した。遠心分離にて培養上清を回収し、20 mL PEG-NaClを混合後、4℃、20分間静置した。10,800 x g、30分間遠心にてファージを沈殿させ、2 mL PBSに懸濁したものを次のパンニングに供した。2回目のパンニングではビーズをPBSTとPBSにて5回ずつ洗浄した。溶出したファージを感染させ得られた大腸菌からAR結合ファージを産生するクローンをELISAにて選択した。

### 【0052】

#### (b) ファージELISA

上記のシングルコロニーを150 $\mu$ L 2xYTAGに植菌し、30℃で一晩培養した。この5 $\mu$ Lを500 $\mu$ L 2xYTAGに植菌、37℃、2時間培養後、ヘルパーファージ2.5 x 10<sup>9</sup>pfuと0.3 $\mu$ L 1mol/L IPTGを含む2xYTAGを100 $\mu$ L添加し37℃にて30分間静置した。続いて30℃にて一晩培養し、遠心上清をELISAに供した。StreptaWell 96マイクロタイタープレート (Roche) を1.0 $\mu$ g/mLビオチン標識AR1FLAGもしくはAR2FLAGを含むPBS 100 $\mu$ Lにて一晩コートした。PBSTにて洗浄し抗原を除いた後、2 w/v % M-PBS 200 $\mu$ Lで一晩ブロッキングした。2%(w/v) M-PBSを除き、ここに培養上清を加え40分間静置し抗体を結合させた。洗浄後、結合ファージは2 w/v % M-PBSにて希釈したHRP結合抗M13抗体 (Amersham Pharmacia Biotech) とBM blue POD基質 (Roche) で検出し、硫酸の添加により反応を停止した後、A450の値を測定した。

### 【0053】

#### (c) 配列決定とクローン選択

ELISAにて陽性であったクローンのファージ液からプライマーPBG3-F1 (5'- CAGCTATGAAATACCTATTGCC -3' / 配列番号: 27) とPBG3-R1 (5'- CTTTTCATAATCAAAATCACCGG -3' / 配列番号: 28) を用いてPCRにてscFv領域を増幅し、その塩基配列決定した。ファージ液1 $\mu$ L、10 x KOD Dash緩衝液2 $\mu$ L、10 $\mu$ mol/Lプライマーを0.5 $\mu$ Lづつ、KOD Dashポリメラーゼ (TOYOBO、2.5 U/ $\mu$ L) 0.3 $\mu$ Lを含むPCR反応液20 $\mu$ Lを、Perkin Elmer9700で96℃、10秒、55℃、10秒、72℃、30秒、30



サイクルの増幅を行なった。PCR後、5 $\mu$ Lの反応液にExoSAP-IT（アマシャム）を3 $\mu$ L添加し、37℃、20分間、引き続き80℃、15分間保温した。このサンプルについてPBG3-F2（5'-ATTGCCTACGGCAGCCGCT-3'／配列番号：29）あるいはPBG3-R2（5'-AAATCACCGGAACCAGAGCC-3'／配列番号：30）をプライマーとしてBigDye Terminator Cycle Sequencing kit（Applied Biosystems）にて反応を行ない、Applied Biosystems PRISM 3700 DNA Sequencerで泳動した。塩基配列から推定されるアミノ酸配列のCDR3の異なるクローンを抗AR1及び抗AR2についてそれぞれ45クローンずつ選択した。

#### 【0054】

##### 〔実施例3〕 二種特異性抗体の発現

scFv-CH1-Fcとして発現させるためにCAGGプロモーターで駆動されるヒトシグナル配列とイントロン-CH1-Fc（ヒトIgG4 cDNA）の間にSfiIサイトを介してscFvを挿入できる発現ベクターpCAGGss-g4CHヘテロIgG4を構築した。ヘテロ分子として発現させるためにIgG1のknobs-into-holes（Protein Engineering vol.9, 617-621, 1996）を参考にIgG4のCH3部分へのアミノ酸置換体を作成した。AタイプはY349C、T366Wの置換体である。BタイプはE356C、T366S、L368A、Y407Vの置換体である。両者のヒンジ部分にも置換（-ppcpScp- → -ppcpPcp-）を導入した。またAタイプにはヒトIL-3のシグナル配列を、BタイプにはヒトIL-6のシグナル配列を用いて構築した（pCAGG-IL3ss-g4CHPa, pCAGG-IL6ss-g4CHPb）。塩基配列より選択したクローンのscFv領域のPCR産物をSfiI処理し、抗AR1クローンはpCAGG-IL3ss-g4CHPaに、抗AR2クローンはpCAGG-IL3ss-g4CHPbにサブクローニングした。抗AR1及び抗AR2クローン45 x 45の合計2025種類の全組み合わせについて発現ベクターをHEK293細胞にリポフェクトアミン2000を用いてトランスフェクションし、3日後の培養上清を回収した。

#### 【0055】

##### 〔実施例4〕 アゴニスト二種特異性抗体の分離

###### （a）BaF3増殖アッセイ

BaF3-ARGはマウスIL-3依存性増殖細胞BaF3にAR1及びAR2の細胞外領域とG-CSF受容体の細胞内領域とのキメラ分子の発現ベクターを導入して樹立した。BaF3-A

RGはIFN $\alpha$ に依存して増殖した。3度洗浄したウエル当り $1 \times 10^3$ 個の細胞およびサンプルを含む0.1mLの培地で96ウエルプレートに播種した。4日間培養後10 $\mu$ Lの生細胞数測定試薬SF (nacalai tesque) を添加し、2時間37℃保温した後A450を測定した。

#### 【0056】

##### (b) Daudi細胞増殖抑制アッセイ

Daudi細胞はIFNに対して高感受性を示すヒトB細胞株である。サンプルを含む0.1mLの培地でウエル当り $6.25 \times 10^3$ 個の細胞を96ウエルプレートに播種した。4日間培養後10 $\mu$ Lの生細胞数測定試薬SF (nacalai tesque) を添加し、2時間37℃保温した後、A450を測定した。

#### 【0057】

##### (c) アゴニスト二種特異性抗体の配列

上記スクリーニングにて選択された抗体の可変領域のアミノ酸配列を、配列番号: 1~26に示す。各抗体の名称および配列番号との関係は、上記表1に示す。

#### 【0058】

##### 【発明の効果】

本発明によりヘテロ鎖を含む受容体に対してアゴニスト作用を有する抗体が提供された。本発明の抗体は、血中での安定性が高く、抗原性もないものと考えられることから、医薬品となるものと大いに期待される。

#### 【0059】

##### 【配列表】

#### SEQUENCE LISTING

<110> CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA

<120> Agonist antibodies that bind to hetro receptors

<130> C1-A0228

<160> 30

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 120

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala  
1 5 10 15  
Ser Val Arg Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Phe Tyr  
20 25 30  
Trp Ile Asn Trp Ile Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
35 40 45  
Gly Arg Ile Asp Pro Tyr Asp Ser Glu Thr Arg Tyr Asn Gln Lys Phe  
50 55 60  
Lys Asp Lys Ala Ile Leu Thr Val Asp Lys Tyr Ser Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80  
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95  
Ala Lys Gly Val Tyr Asp Gly His Trp Phe Phe Asp Val Trp Gly Ala  
100 105 110  
Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser  
115 120

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 108

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 2

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly  
 1                      5                      10                      15  
 Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala  
                     20                      25                      30  
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile  
                     35                      40                      45  
 Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly  
                     50                      55                      60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Thr  
 65                      70                      75                      80  
 Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Arg Thr Pro Pro  
                     85                      90                      95  
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg  
                     100                      105

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 119

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 3

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Glu Lys Pro Gly Ala

1                      5                      10                      15  
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Ser Asp Tyr  
                     20                      25                      30  
 Asn Met Asn Trp Val Lys Gln Ser Asn Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile  
                     35                      40                      45  
 Gly Asn Ile Asp Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe  
                     50                      55                      60  
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Leu Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
 65                      70                      75                      80  
 Met Gln Leu Lys Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys  
                     85                      90                      95  
 Ala Arg Ser Arg Gly Trp Leu Leu Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly  
                     100                      105                      110  
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ala  
                     115

<210> 4

<211> 108

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Asp Ile Leu Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly  
 1                      5                      10                      15  
 Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Ile Asn  
                     20                      25                      30  
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Ala Leu Ile  
                     35                      40                      45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly  
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser  
 65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu  
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
 100 105

<210> 5

<211> 117

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Arg Pro Gly Val  
 1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr  
 20 25 30

Ala Ile His Trp Val Arg Gln Ser His Ala Gln Ser Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45

Gly Val Ile Gly Thr Tyr Ser Gly Asn Arg Asn Tyr Asn Gln Lys Phe  
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ala Arg Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Arg Ser Ala Gly Tyr Ser Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Ser

100 105 110  
Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 6

<211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly  
1 5 10 15  
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser  
20 25 30  
Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser  
35 40 45  
Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro  
50 55 60  
Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
65 70 75 80  
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly  
85 90 95  
Lys His Phe Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
100 105 110

<210> 7

<211> 119

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Gly Glu Leu Val Arg Pro Gly Thr  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Asn Tyr  
 20 25 30  
 Leu Ile Glu Trp Ile Arg Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
 Gly Val Ile Asn Pro Gly Ser Gly Asn Ser Lys Ser Ser Lys Asn Leu  
 50 55 60  
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Ser Gly Val Tyr Gly Ser Ser Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110  
 Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 8

<211> 113

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly



1                      5                      10                      15  
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser  
                     20                      25                      30  
 Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser  
                     35                      40                      45  
 Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro  
                     50                      55                      60  
 Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65                      70                      75                      80  
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly  
                     85                      90                      95  
 Thr His Phe Pro Gln Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
                     100                      105                      110  
 Arg

<210> 9

<211> 118

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Gly Glu Leu Val Arg Pro Gly Thr  
 1                      5                      10                      15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Asn Tyr  
                     20                      25                      30  
 Leu Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Asp Trp Ile  
                     35                      40                      45

Gly Met Ile Asn Pro Gly Ser Gly Gly Thr Lys Cys Asn Lys Lys Phe  
 50 55 60

Lys Gly Lys Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

Met His Leu Ser Ser Leu Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys  
 85 90 95

Ala Arg Ser Gly Trp Val Ser Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110

Ser Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 10

<211> 113

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly  
 1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser  
 20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro  
 50 55 60

Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly

85 90 95  
 Thr His Phe Pro Gln Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys  
 100 105 110

Arg

<210> 11  
 <211> 118  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 11

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Val Glu Leu Val Arg Pro Gly Thr  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Asn Tyr  
 20 25 30  
 Leu Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Asp Trp Ile  
 35 40 45  
 Gly Met Ile Asn Pro Gly Ser Gly Gly Thr Lys Cys Asn Lys Lys Phe  
 50 55 60  
 Lys Gly Lys Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Met His Leu Ser Ser Leu Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Ser Gly Trp Val Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110  
 Ser Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 12

<211> 113

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly  
 1                    5                    10                    15  
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser  
                   20                    25                    30  
 Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser  
                   35                    40                    45  
 Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro  
                   50                    55                    60  
 Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65                    70                    75                    80  
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly  
                   85                    90                    95  
 Thr His Phe Pro Gln Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys  
                   100                    105                    110  
 Arg

<210> 13

<211> 117

<212> PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 13

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Arg Pro Gly Val  
 1                      5                      10                      15  
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Arg Phe Thr Asp Tyr  
                     20                      25                      30  
 Ala Ile His Trp Val Lys Gln Ser His Ala Lys Ser Leu Glu Trp Ile  
                     35                      40                      45  
 Gly Val Ile Ser Thr Tyr Tyr Gly Asn Thr Arg Tyr Asn Gln Lys Phe  
                     50                      55                      60  
 Lys Gly Lys Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
 65                      70                      75                      80  
 Met Glu Leu Ala Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Val Ile Tyr Tyr Cys  
                     85                      90                      95  
 Ala Arg Ser Gly Gly Ser Leu Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser  
                     100                      105                      110  
 Val Thr Val Ser Ser  
                     115

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 113

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 14

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly  
 1                      5                      10                      15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser  
 20 25 30  
 Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45  
 Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro  
 50 55 60  
 Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65 70 75 80  
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly  
 85 90 95  
 Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105 110  
 Arg

<210> 15

<211> 117

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Arg Pro Gly Val  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr  
 20 25 30  
 Ala Met His Trp Val Lys Gln Ser His Ala Lys Ser Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
 Gly Val Ile Ser Thr Tyr Tyr Ser Asn Thr Arg Tyr Asn Gln Lys Phe

50                      55                      60  
 Lys Gly Lys Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
 65                      70                      75                      80  
 Met Glu Leu Ala Arg Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys  
                     85                      90                      95  
 Val Arg Ser Gly Gly Ser Asn Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser  
                     100                      105                      110  
 Val Thr Val Ser Ser  
                     115

<210> 16  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 16  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly  
 1                      5                      10                      15  
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser  
                     20                      25                      30  
 Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser  
                     35                      40                      45  
 Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro  
                     50                      55                      60  
 Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65                      70                      75                      80  
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly  
                     85                      90                      95

Thr His Phe Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105 110

Arg

<210> 17  
 <211> 117  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 17

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Arg Pro Gly Val  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Ser Tyr Lys Phe Thr Asp Tyr  
 20 25 30  
 Ala Met His Trp Val Lys Gln Ser His Ala Lys Ser Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
 Gly Val Ile Ser Thr Tyr Tyr Gly Asn Val Lys Tyr Asn Gln Lys Phe  
 50 55 60  
 Lys Gly Lys Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Glu Leu Ala Arg Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Ser Ser Gly Ser Tyr Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser  
 100 105 110  
 Val Thr Val Ser Ser  
 115



&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 113

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 18

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly  
 1                      5                      10                      15  
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser  
                     20                      25                      30  
 Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser  
                     35                      40                      45  
 Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro  
                     50                      55                      60  
 Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65                      70                      75                      80  
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly  
                     85                      90                      95  
 Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
                     100                      105                      110  
 Arg

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 119

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 19

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Thr  
 1                      5                      10                      15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Asn Tyr  
                     20                      25                      30  
 Leu Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Pro Glu Trp Ile  
                     35                      40                      45  
 Gly Val Ile Asn Pro Gly Ser Gly Asn Ile Arg Tyr Asn Gly Lys Phe  
                     50                      55                      60  
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
 65                      70                      75                      80  
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys  
                     85                      90                      95  
 Ala Arg Asp Ala Tyr Tyr Val Gly Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
                     100                      105                      110  
 Thr Ser Val Thr Val Ser Ser  
                     115

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 113

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 20

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly  
 1                      5                      10                      15  
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser

	20	25	30
Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser			
35	40	45	
Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro			
50	55	60	
Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile			
65	70	75	80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly			
85	90	95	
Thr His Phe Pro Gln Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys			
100	105	110	
Arg			

<210> 21  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 21

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Glu Ala Glu Leu Val Arg Pro Glu Thr			
1	5	10	15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Arg Asn Tyr			
20	25	30	
Leu Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile			
35	40	45	
Gly Val Ile Asn Pro Gly Ser Gly Asn Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe			
50	55	60	

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
 65                                      70                                      75                                      80  
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys  
                                     85                                      90                                      95  
 Ala Arg Asp Gly Tyr Tyr Leu Gly Thr Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
                                     100                                      105                                      110  
 Thr Ser Val Thr Val Ser Ser  
                                     115

<210> 22

<211> 113

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

Asp Ile Val Leu Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly  
 1                                      5                                      10                                      15  
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser  
                                     20                                      25                                      30  
 Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser  
                                     35                                      40                                      45  
 Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro  
                                     50                                      55                                      60  
 Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65                                      70                                      75                                      80  
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly  
                                     85                                      90                                      95  
 Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100

105

110

Arg

&lt;210&gt; 23

&lt;211&gt; 119

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 23

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Thr  
1 5 10 15  
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ile Asn Asn  
20 25 30  
Leu Ile Glu Trp Val Gln Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
35 40 45  
Gly Val Ile Asn Pro Gly Ser Gly Asn Val Lys Tyr Asn Glu Lys Phe  
50 55 60  
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80  
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys  
85 90 95  
Ala Arg Asp Gly Tyr Tyr Leu Gly Thr Met Asp His Trp Gly Gln Gly  
100 105 110  
Thr Ser Val Thr Val Ser Ser  
115

&lt;210&gt; 24

&lt;211&gt; 113

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 24

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly  
 1                      5                      10                      15  
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser  
                     20                      25                      30  
 Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser  
                     35                      40                      45  
 Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro  
                     50                      55                      60  
 Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65                      70                      75                      80  
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly  
                     85                      90                      95  
 Thr His Phe Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys  
                     100                      105                      110  
 Arg

&lt;210&gt; 25

&lt;211&gt; 117

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 25

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Arg Pro Gly Val  
1 5 10 15  
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Ser Tyr Lys Phe Thr Asp Tyr  
20 25 30  
Ala Met His Trp Val Lys Gln Ser His Ala Lys Ser Leu Glu Trp Ile  
35 40 45  
Gly Val Ile Ser Thr Tyr Tyr Gly Asn Val Lys Tyr Asn Gln Lys Phe  
50 55 60  
Lys Gly Lys Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80  
Met Glu Leu Ala Arg Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95  
Ala Arg Ser Tyr Gly Ser Tyr Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser  
100 105 110  
Val Thr Val Ser Ser  
115

&lt;210&gt; 26

&lt;211&gt; 112

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 26

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly  
1 5 10 15  
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser  
20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45  
 Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro  
 50 55 60  
 Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65 70 75 80  
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly  
 85 90 95  
 Thr His Phe Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105 110

<210> 27

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 27

cagctatgaa atacctattg cc

22

<210> 28

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial



<220>

<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 28

cttttcataa tcaaaatcac cgg

23

<210> 29

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 29

attgcctacg gcagccgct

19

<210> 30

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 30

aaatcaccgg aaccagagcc

20

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 ヘテロ鎖を含む受容体に対してアゴニスト作用を有する二種特異性 (bispecific) 抗体の提供を課題とする。

【解決手段】 動物に受容体のA鎖、B鎖それぞれを免疫した後、この動物の脾細胞からmRNAを抽出し、CDRに対応するプライマーを用いてRT-PCRにてL鎖、H鎖の可変領域を回収した。assembly PCRにて一本鎖Fvを合成し、ファージライブラリーを構築した。パンニングによって抗原結合抗体クローンを濃縮・クローン化し、その一本鎖可変領域を動物細胞用のシグナル配列とCH1-hinge-CH2-CH3の間に挿入し、scFv-CH1-Fc発現ベクターを作製した。様々な組み合わせで細胞に導入、抗体を発現させ、リガンド同様の活性を示す抗体クローンを選択した。

【選択図】 なし

【書類名】 手続補正書  
【整理番号】 C1-A0228  
【提出日】 平成15年 7月24日  
【あて先】 特許庁長官殿  
【事件の表示】  
【出願番号】 特願2002-377078  
【補正をする者】  
【識別番号】 000003311  
【氏名又は名称】 中外製薬株式会社  
【代理人】  
【識別番号】 100102978  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 清水 初志  
【手続補正1】  
【補正対象書類名】 特許願  
【補正対象項目名】 発明者  
【補正方法】 変更  
【補正の内容】  
【発明者】  
【住所又は居所】 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内  
【氏名】 小嶋 哲郎  
【発明者】  
【住所又は居所】 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内  
【氏名】 妹尾 千明  
【発明者】  
【住所又は居所】 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内  
【氏名】 名取 修  
【発明者】  
【住所又は居所】 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内  
【氏名】 糟谷 恵子  
【発明者】  
【住所又は居所】 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内  
【氏名】 石井 慎也  
【その他】 本補正書で補正する理由は、発明者である糟谷恵子の氏名を、出願時に誤って「糟谷圭子」としてしまった為であります。

## 認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2002-377078
受付番号	50301222112
書類名	手続補正書
担当官	駒崎 利徳
作成日	平成 15 年 7 月 29 日

8640

## &lt;認定情報・付加情報&gt;

## 【補正をする者】

## 【識別番号】

000003311

## 【住所又は居所】

東京都北区浮間 5 丁目 5 番 1 号

## 【氏名又は名称】

中外製薬株式会社

## 【代理人】

申請人

## 【識別番号】

100102978

## 【住所又は居所】

茨城県土浦市卸町 1-1-1 関鉄つくばビル 6

階 清水国際特許事務所

## 【氏名又は名称】

清水 初志

特願2002-377078

出願人履歴情報

識別番号

[000003311]

1. 変更年月日  
[変更理由]

住所  
氏名

1990年 9月 5日

新規登録

東京都北区浮間5丁目5番1号

中外製薬株式会社